





© BSN 2011

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Mangala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Komposisi	1
5 Syarat mutu.....	1
6 Pengambilan contoh	2
7 Cara uji	2
8 Syarat lulus uji.....	3
9 Higiene.....	3
10 Pengemasan.....	3
11 Syarat penandaan	3
Lampiran A (normatif) Cara uji teh instan	4

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Teh instan* ini merupakan SNI baru. Standar ini dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut :

- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Mendukung perkembangan dan diversifikasi produk industri teh instan.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan hal-hal yang tertera dalam :

1. Undang-Undang Republik Indonesia No.5 Tahun 1984 tentang Perindustrian.
2. Undang-Undang Republik Indonesia No.36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
3. Undang-Undang Republik Indonesia No.7 Tahun 1996 tentang Pangan.
4. Undang-Undang Republik Indonesia No.8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
5. Peraturan Pemerintah No.69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
6. Peraturan Pemerintah No.28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan.
7. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.52.0685 Tahun 2005 tentang Ketentuan Pokok Pengawasan Pangan Fungsional.
8. Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.
9. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan RI No. HK.00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Kimia dalam Makanan.

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis 67-04 Makanan dan Minuman, yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 10 November 2009 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, Badan Pengawas Obat dan Makanan, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 27 April 2011 sampai dengan tanggal 26 Juni 2011 dengan hasil akhir RASNI.

Teh instan

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji teh instan.

2 Acuan normatif

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

3 Istilah dan definisi

3.1

teh instan

teh berbentuk serbuk yang mudah larut dalam air diperoleh melalui proses ekstraksi teh (*Camellia sinensis* L.), penyaringan, pemekatan, dan pengeringan, dengan atau tanpa penambahan bahan pangan lain, bahan tambahan pangan yang diizinkan, dan dikemas secara kedap

4 Komposisi

4.1 Bahan baku

daun teh (*Camellia sinensis* L.) baik yang segar maupun yang telah diolah.

4.2 Bahan pangan lain

bahan pangan yang diizinkan untuk teh instan sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

4.3 Bahan tambahan pangan

bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk teh instan sesuai dengan ketentuan yang berlaku

5 Syarat mutu

Syarat mutu teh instan sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 - Syarat mutu teh instan

No	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Pemerian	-	serbuk
1.2	Bau	-	khas teh
1.3	Rasa	-	khas teh
2	Kadar air (b/b)	%	maks. 5,0

Tabel 1 (lanjutan)

No	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
3	Abu (b/b)	%	maks. 20
4	Kadar polifenol (b/b)	%	min. 12* min. 20**
5	Cemaran logam		
5.1	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,2
5.2	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 2,0
5.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40,0
5.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,03
6	Cemaran Arsen (As)	mg/kg	maks. 1,0
7	Cemaran mikroba		
7.1	Angka lempeng total (35 °C, 48 jam)	koloni/g	maks. 3×10^3
7.2	Bakteri <i>Coliform</i>	APM/g	< 3
7.3	Kapang	koloni/g	maks. 5×10^2
Keterangan : * teh hitam ** teh hijau			

6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428, Petunjuk pengambilan contoh padatan.

7 Cara uji

Cara uji untuk teh instan seperti di bawah ini:

- Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1
- Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2
 - Cara uji pemerian sesuai Lampiran A.2.2
 - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.2
 - Cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.3
- Cara uji kadar air sesuai Lampiran A.3
- Cara uji abu sesuai Lampiran A.4
- Cara uji kadar polifenol sesuai Lampiran A.5
- Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.6
 - Cara uji kadmium (Cd) dan timbal (Pb) sesuai Lampiran A.6.1
 - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.6.2
 - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.6.3
- Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.7
- Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.8
 - Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji angka lempeng total dan bakteri *Coliform* sesuai Lampiran A.8.1
 - Cara uji angka lempeng total (35 °C, 48 jam) sesuai Lampiran A.8.2
 - Cara uji bakteri *Coliform* sesuai Lampiran A.8.3

- Cara uji kapang sesuai Lampiran A.8.4

8 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai pasal 5.

9 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

10 Pengemasan

Produk dikemas dalam wadah yang tertutup kedap, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

11 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.



Lampiran A
(normatif)
Cara uji teh instan

A.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan uji kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan uji kimia.

A.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan contoh teh instan dan ambil contoh secara aseptik sebanyak 150 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

A.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik

Buka kemasan contoh teh instan dan ambil contoh secukupnya kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.1.3 Persiapan contoh untuk uji kimia

Buka kemasan contoh teh instan dan ambil contoh sebanyak 400 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.2 Keadaan**A.2.1 Pemerian****A.2.1.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penglihatan yang dilakukan oleh panelis yang terlatih dan kompeten untuk pengujian organoleptik.

A.2.1.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) raba contoh uji untuk mengetahui pemerian-nya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika teraba serbuk, maka hasil dinyatakan "serbuk"; dan
- b) jika teraba selain serbuk, maka hasil dinyatakan "sesuai pengamatan".

A.2.2 Bau**A.2.2.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.2.2 Cara kerja

- d) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- e) cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- f) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak tercium bau asing, maka hasil dinyatakan “khas teh”; dan
- b) jika tercium bau asing, maka hasil dinyatakan “tidak normal”.

A.2.3 Rasa**A.2.3.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.3.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan rasakan dengan indera pengecap (lidah); dan
- b) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.3.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika rasa contoh sesuai dengan rasa teh, maka hasil dinyatakan “khas teh”; dan
- b) jika rasa contoh tidak sesuai dengan rasa teh, maka hasil dinyatakan “tidak khas teh”.

A.3 Kadar air**A.3.1 Prinsip**

Kadar air dihitung berdasarkan bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada suhu $(105 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

A.3.2 Peralatan

- a) Oven terkalibrasi dengan ketelitian $1 ^\circ\text{C}$;
- b) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) Desikator yang berisi desikan; dan
- d) Cawan nikel, platina atau aluminium tertutup.

A.3.3 Cara kerja

- a) Panaskan cawan beserta tutupnya dalam oven pada suhu $(105 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama lebih kurang satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 20 menit sampai dengan 30 menit, kemudian timbang dengan neraca analitik (cawan dan tutupnya) (W_0);
- b) masukan 5 g contoh ke dalam cawan, tutup dan timbang (W_1);
- c) panaskan cawan yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup cawan di samping pinggan di dalam oven pada suhu $(105 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama tiga jam;
- d) tutup cawan ketika masih di dalam oven, pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 20 sampai dengan 30 menit kemudian timbang;
- e) lakukan pemanasan kembali selama satu jam dan ulangi kembali perubahan berat antara pemanasan selama satu jam mempunyai interval $\leq 2 \text{ mg}$ (W_2);

- f) lakukan pekerjaan duplo dan
- g) hitung kadar air dalam contoh.

A.3.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air (\%)} = \left(\frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \right) \times 100\%$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot cawan kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot cawan, tutupnya dan contoh sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g);

W_2 adalah bobot cawan, tutupnya dan contoh setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g).

A.3.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar air. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.4 Abu

A.4.1 Prinsip

Kadar abu dihitung berdasarkan bobot abu yang terbentuk selama pembakaran dalam tanur pada suhu $(550 \pm 5) ^\circ\text{C}$ sampai terbentuk abu berwarna putih.

A.4.2 Peralatan

- a) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian $1 ^\circ\text{C}$;
- b) Oven terkalibrasi dengan ketelitian $1 ^\circ\text{C}$;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Pemanas listrik;
- e) Penangas air;
- f) Desikator yang berisikan desikan; dan
- g) Cawan pengabuan.

A.4.3 Cara kerja

- a) Panaskan cawan dalam tanur pada suhu $(550 \pm 5) ^\circ\text{C}$ selama lebih kurang satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 30 menit kemudian timbang dengan neraca analitik (W_0);
- b) masukkan 5 g sampai dengan 10 g contoh ke dalam cawan dan timbang (W_1);
- c) panaskan cawan yang berisi contoh tersebut dalam oven pada suhu $(105 \pm 2) ^\circ\text{C}$ sampai H_2O hilang;
- d) tempatkan cawan yang berisi contoh tersebut dalam tanur pada suhu $550 ^\circ\text{C}$ sampai terbentuk abu berwarna putih;
- e) tambahkan air ke dalam abu, keringkan dalam penangas air kemudian lanjutkan pada pemanas listrik kemudian abukan kembali pada suhu $550 ^\circ\text{C}$ sampai mencapai berat yang tetap;
- f) pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 30 menit kemudian timbang (W_2);
- g) lakukan pekerjaan duplo, dan
- h) hitung kadar abu dalam contoh.

A.4.4 Perhitungan

$$\text{Abu (\%)} = \left(\frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \right) \times 100 \%$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot cawan kosong, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot cawan dan contoh sebelum diabukan, dinyatakan dalam gram (g); dan

W_2 adalah bobot cawan dan contoh setelah diabukan, dinyatakan dalam gram (g).

A.4.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil abu. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.5 Kadar polifenol

A.5.1 Prinsip

Oksidasi atau reduksi komponen polifenol menggunakan pereaksi *Folin Ciocalteu* dalam media basa, menghasilkan kompleks biru molibdenum-tungsten, yang dibaca pada panjang gelombang 740 nm.

A.5.2 Peralatan

- Spektrofotometer UV-Vis terkalibrasi;
- Penangas ultrasonik;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Magnetic stirrer*;
- Labu ukur 250 mL, 100 mL, 50 mL, dan 25 mL;
- Pipet volumetrik 5 mL, 4 mL, dan 1 mL;
- Tabung reaksi;
- Gelas piala 500 mL dan 100 mL;
- Vortex mixer*; dan
- Botol berwarna coklat.

A.5.3 Pereaksi

- Standar asam galat;
- Pereaksi *Folin Ciocalteu* 10 % ;
pipet larutan *Folin Ciocalteu* pekat sebanyak 10 mL dalam labu ukur 100 mL, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis, kemudian larutkan dan homogenkan. Simpan dalam wadah (botol coklat) agar tidak terkena sinar matahari.
- Pereaksi natrium karbonat 7,5 % ; dan
timbang natrium karbonat sebanyak 7,5 g masukkan dalam gelas piala 100 mL, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis, larutkan dan homogenkan menggunakan *magnetic stirrer*.
- Air suling

A.5.4 Cara kerja

A.5.4.1 Pembuatan deret standar

- Buat standar induk 250 mg/kg, dengan cara menimbang 0,0625 g standar asam galat, kemudian masukkan ke dalam labu ukur 250 mL;
- tambahkan ± 50 mL air suling, dimasukkan dalam penangas ultrasonik selama 10 menit (larut);
- tambahkan air sampai tanda tera, homogenkan;
- buat deret standar 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg dan 100 mg/kg, masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL;
- dari masing-masing larutan tersebut, diambil dengan menggunakan pipet gondok sebanyak 1 mL dan masukkan ke dalam tabung reaksi 15 mL (lindungi dari cahaya);
- tambahkan 5 mL larutan *Follin Ciocalteu* 10 %, diamkan 3 menit sampai dengan 8 menit;
- tambahkan 4 mL natrium karbonat 7,5 %;
- aduk dengan menggunakan *vortex-mixer* sampai homogen;
- diamkan selama 2 jam (lindungi dari cahaya);
- ukur absorbansi masing-masing standar pada panjang gelombang 740 nm;
- buat grafik linearitas standar, konsentrasi (mg/kg) sebagai sumbu x dan absorbansi sebagai sumbu y;
- secara statistik akan didapatkan persamaan $y = a + bx$ (deret standar dibuat minimal 1 bulan sekali).

A.5.4.2 Penentuan kadar polifenol

- Timbang 0,150 gram contoh, masukkan ke dalam labu takar 100 mL;
- tambahkan ± 50 mL, sonifikasi selama 10 menit (larut);
- tambahkan air sampai tera, homogenkan;
- pipet larutan tersebut dengan menggunakan pipet gondok sebanyak 1 mL tempatkan pada labu ukur 50 mL;
- tambahkan aquades hingga tanda tera homogenkan;
- pipet larutan tersebut dengan menggunakan pipet ukur 1 mL dan masukkan ke dalam tabung reaksi 15 mL (lindungi dari cahaya);
- tambahkan 5 mL larutan *Folin Ciocalteu* 10 %, diamkan 3 sampai dengan 8 menit;
- tambahkan 4 mL natrium karbonat 7,5 %;
- aduk dengan menggunakan *vortex-mixer* sampai homogen;
- diamkan selama 2 jam (lindungi dari cahaya);
- ukur absorbansinya pada panjang gelombang 740 nm; dan
- hitung kadar polifenol dalam contoh berdasarkan kurva kalibrasi.

A.5.4.3 Perhitungan

$$\text{Kadar polifenol (\%)} = \frac{[\text{Absorbansi} - a]/b \times 100/1 \times 50/1000 \times 100 \%}{W}$$

Keterangan:

- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
 a adalah intersep linearitas standar;
 b adalah kemiringan linearitas standar.

A.6 Cemarkan logam

A.6.1 Kadmium (Cd) dan timbal (Pb)

A.6.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada suhu 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimal 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

A.6.1.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Penangas air;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- Gelas ukur 10 mL;
- Gelas piala 250 mL;
- Botol polipropilen;
- Cawan porselen/platina/kuarsa 50 mL sampai dengan 100 mL; dan
- Kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi *particle retention liquid* 20 µm sampai dengan 25 µm.

A.6.1.3 Pereaksi

- Asam nitrat, HNO₃ pekat;
- Asam klorida, HCl pekat;
- Larutan asam nitrat, HNO₃ 0,1 N;
encerkan 7 mL HNO₃ pekat dengan air suling dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- Larutan asam klorida, HCl 6 N;
encerkan 500 mL HCl pekat dengan air suling dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- Larutan baku 1 000 µg/mL Cd;
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 mL HNO₃ pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cd 1 000 µg/mL siap pakai.
- Larutan baku 200 µg/mL Cd;
pipet 10 mL larutan baku 1 000 µg/mL Cd ke dalam labu ukur 50 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 µg/mL Cd.
- Larutan baku 20 µg/mL Cd;
pipet 10 mL larutan baku 200 µg/mL Cd ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 µg/mL Cd.
- Larutan baku kerja Cd;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,5 mL, 1 mL; 2 mL; 4 mL; 7 mL dan 9 mL larutan baku 20 µg/mL kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO₃ 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,4 µg/mL;

- 0,8 µg/mL; 1,4 µg/mL dan 1,8 µg/mL Cd.
- i) Larutan baku 1 000 µg/mL Pb;
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL HNO₃ pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1 000 µg/mL siap pakai.
 - j) Larutan baku 50 µg/mL Pb; dan
pipet 5,0 mL larutan baku 1 000 µg/mL Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 µg/mL.
 - k) Larutan baku kerja Pb;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 3 mL dan 4 mL larutan baku 50 µg/mL kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO₃ 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,25 µg/mL; 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 1,5 µg/mL dan 2,0 µg/mL Pb.

A.6.1.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh dengan teliti dalam cawan porselen/ platina/ kuarsa (m);
- b) tempatkan cawan berisi contoh uji di atas pemanas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji tidak berasap lagi;
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur pada suhu (450 ± 5) °C sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO₃ pekat kira-kira 0,5 mL sampai dengan 3 mL;
- e) keringkan cawan di atas pemanas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu (450 ± 5) °C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO₃ pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas pemanas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan HNO₃ 0,1 N dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring, ke dalam botol polipropilen;
- g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- h) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- k) hitung kandungan logam dalam contoh.

A.6.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{M} \times V$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL);
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL); dan
- m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.6.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan logam. Jika kisaran lebih besar dari 16 % , maka uji, harus diulang kembali.

A.6.2 Timah (Sn)

A.6.2.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian tambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$.

A.6.2.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Penangas air;
- Pemanas listrik;
- Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- Pipet ukur 10 mL, 5 mL, berskala 0,1 mL, terkalibrasi;
- Erlenmeyer 250 mL;
- Gelas ukur 50 mL; dan
- Gelas piala 250 mL.

A.6.2.3 Pereaksi

- Larutan kalium klorida, 10 mg/mL K; larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 mL.
- Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- Asam klorida, HCl pekat;
- Larutan baku 1000 $\mu\text{g/mL}$ Sn; dan larutkan 1,000 g Sn dengan 200 mL HCl pekat dalam labu ukur 1000 mL, tambahkan 200 mL air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan baku kerja Sn. pipet 10 mL HCl pekat dan 1,0 mL larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL dan 2,5 mL larutan baku 1000 $\mu\text{g/mL}$ Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 5 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$; 15 $\mu\text{g/mL}$; 20 $\mu\text{g/mL}$ dan 25 $\mu\text{g/mL}$ Sn.

A.6.2.4 Cara kerja

- Timbang 10 g sampai dengan 20 g (m) dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 mL, tambahkan 30 mL HNO_3 pekat dan biarkan 15 menit;
- panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 mL sampai dengan 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- angkat Erlenmeyer dari pemanas listrik, tambahkan 25 mL HCl pekat, dan panaskan selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl_2 berhenti;
- tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai dengan 15 mL;

- f) tambahkan 40 mL air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas Erlenmeyer tersebut dengan 10 mL air suling (V);
- g) tambahkan 1,0 mL KCl, dinginkan pada suhu ruang, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis dan saring;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi $N_2O-C_2H_2$;
- j) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- k) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- l) lakukan pengerjaan duplo; dan
- m) hitung kandungan logam dalam contoh.

A.6.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$)
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL); dan
 m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.6.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan logam. Jika kisaran lebih besar dari 16 % , maka uji harus diulang kembali.

A.6.3 Merkuri (Hg)

A.6.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan NaBH_4 atau SnCl_2 dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang maksimal 253,7 nm.

A.6.3.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- b) *Microwave digester*;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Pemanas listrik;
- e) Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- f) Tabung destruksi;
- g) Labu destruksi 250 mL berdasar bulat;
- h) Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- i) Gelas ukur 25 mL;
- j) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi; dan
- k) Gelas piala 500 ml.

A.6.3.3 Pereaksi

- a) Larutan asam sulfat, H_2SO_4 9 M;
- b) Larutan asam nitrat, HNO_3 7 M;
- c) Campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1);
- d) Hidrogen peroksida, H_2O_2 pekat;
- e) Larutan natrium molibdat, $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 % ;
- f) Larutan pereduksi;
campurkan 50 mL H_2SO_4 dengan 300 mL air suling dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- g) Larutan natrium borohidrida, NaBH_4 ;
larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 mL.
- h) Larutan pengencer;
masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL air suling kedalam labu ukur 1 000 mL dan tambahkan 58 mL HNO_3 kemudian tambahkan 67 mL H_2SO_4 . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- i) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Hg;
larutkan 0,135 4 g HgCl_2 dengan kira-kira 25 mL air suling dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- j) Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ Hg;
Pipet 1 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Hg ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$.
- k) Larutan baku kerja Hg; dan
Pipet masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; dan 2 mL larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,002 5 $\mu\text{g/mL}$; 0,005 $\mu\text{g/mL}$; 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$ Hg.
- l) Batu didih

A.6.3.4 Cara kerja

A.6.3.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g contoh (m) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL H_2SO_4 9 M, 20 mL HNO_3 7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2 % , dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- b) hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas pemanas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- c) tambahkan 20 mL campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1) melalui pendingin;
- d) hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- e) tambahkan 10 mL air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- f) didihkan lagi selama 10 menit;
- g) matikan pemanas listrik dan cuci pendingin dengan 15 mL air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu ruang;
- h) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- i) pipet 25 mL larutan di atas ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;

- j) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- k) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- l) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- m) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- n) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- o) lakukan pengerjaan duplo; dan
- p) hitung kandungan logam dalam contoh.

A.6.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- e) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- f) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- g) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- h) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- i) lakukan pengerjaan duplo; dan
- j) hitung kandungan logam dalam contoh;

A.6.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi merkuri dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

A.6.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan logam. Jika kisaran lebih besar dari 16 % , maka uji harus diulang kembali.

A.7 Cemarkan arsen (As)

A.7.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan NaBH_4 atau SnCl_2 sehingga terbentuk AsH_3 yang

kemudian dibaca dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 193,7 nm.

A.7.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1°C ;
- Microwave digester* ;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Burner* atau *bunsen*;
- Labu *Kjeldahl* 250 mL;
- Labu terbuat dari borosilikat berdasar bulat 50 mL;
- Labu ukur 1000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas ukur 25 mL;
- Pipet volumetrik 25 mL;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- Cawan porselen 50 mL; dan
- Gelas piala 200 mL.

A.7.3 Pereaksi

- Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- Asam sulfat, H_2SO_4 pekat;
- Asam perklorat, HClO_4 pekat;
- Ammonium oksalat, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ jenuh;
- Hidrogen peroksida, H_2O_2 pekat;
- Larutan natrium borohidrida, NaBH_4 4 % ;
larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 mL.
- Larutan asam klorida, HCl 8 M;
larutkan 66 mL HCl pekat kedalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan timah (II) klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 % ;
timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam gelas piala 200 mL dan tambahkan 100 mL HCl pekat. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan kalium iodida, KI 20 % ;
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- Larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/mL;
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 mL H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 mL HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan air suling;
- Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ As;
larutkan 1,320 3 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20 % dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1000 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan baku 100 $\mu\text{g/mL}$ As;
pipet 10 mL larutan baku As 1 000 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ As.
- Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As; dan
pipet 1 mL larutan baku As 100 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$ As.

- n) Larutan baku kerja As;
pipet masing-masing 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL dan 5,0 mL larutan baku 1 µg/mL As ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 µg/mL; 0,02 µg/mL; 0,03 µg/mL; 0,04 µg/mL dan 0,05 µg/mL As.

A.7.4 Cara kerja

A.7.4.1 Pengabuan basah

- Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (m) ke dalam labu *Kjeldahl* 250 mL, tambahkan 5 mL sampai dengan 10 mL HNO₃ pekat dan 4 mL sampai dengan 8 mL H₂SO₄ pekat dengan hati-hati;
- setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO₃ pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- tambahkan 2 mL HClO₄ 70 % sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangkan setelah penambahan HClO₄, tambahkan lagi sedikit HNO₃ pekat);
- dinginkan, tambahkan 15 mL H₂O dan 5 mL (NH₄)₂C₂O₄ jenuh;
- panaskan sehingga timbul uap SO₃ di leher labu;
- dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- pipet 25 mL larutan diatas dan tambahkan 2 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi (NaBH₄) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan As dalam contoh.

A.7.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO₃, 1 mL H₂O₂ kemudian tutup rapat;
- masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- pipet 10 mL larutan destruksi ke dalam labu terbuat dari borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan Mg(NO₃)₂, Uapkan di atas pemanas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu 450 °C (± 1 jam);
- dinginkan, larutkan dengan 2,0 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20 % dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- siapkan NaBH₄ dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- tuangkan larutan baku kerja As 0,01 µg/mL; 0,02 µg/mL; 0,03 µg/mL; 0,04 µg/mL; 0,05 µg/mL serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan *burner* atau *bunsen* serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;

- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh.

A.7.4.3 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi arsen (As) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

A.7.4.4 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan arsen (As). Jika kisaran lebih besar dari 16 % , maka uji harus diulang kembali.

A.8 Cemarkan mikroba

A.8.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji angka lempeng total dan bakteri *Coliform*

A.8.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk menggiatkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

A.8.1.2 Peralatan

- a) Alat homogenisasi yang sesuai (blender) dengan kecepatan putaran 10000 rpm sampai dengan 12 000 rpm;
- b) autoklaf;
- c) pemanas listrik;
- d) neraca kapasitas 2 000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- e) labu ukur 1000 mL, 500 mL, 100 mL dan 50 mL terkalibrasi.
- f) gelas piala steril;
- g) Erlenmeyer steril;
- h) botol pengencer steril;
- i) pipet volumetrik steril 10,0 mL dan 1,0 mL terkalibrasi dilengkapi dengan *bulb* dan *pipettor*, terkalibrasi;
- j) tabung reaksi; dan
- k) sendok, gunting, dan spatula steril.

A.8.1.3 Larutan pengencer

Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB);

- KH_2PO_4 34 g
- air suling 500 mL

Atur pH dengan NaOH sehingga mencapai pH 7,2, tepatkan volume sampai 1 000 mL dengan air suling. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit, simpan pada refrigerator. Untuk membuat larutan pengencer, 1,25 mL larutan stok diencerkan dengan air suling sampai volume 1 000 mL. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam botol pengencer sebanyak 450 mL dan tabung reaksi sebanyak 9 mL kemudian disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.8.1.4 Homogenisasi contoh

- a) Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pengencer sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- b) kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.8.2 Angka lempeng total (35 °C, 48 jam)

A.8.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 48 jam pada suhu (35 ± 1) °C.

A.8.2.2 Peralatan

- a) Inkubator (35 ± 1) °C terkalibrasi;
- b) oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- c) autoklaf;
- d) penangas air bersirkulasi (45 ± 1) °C;
- e) alat penghitung koloni;
- f) *tally register*;
- g) botol pengencer 160 mL terbuat dari gelas borosilikat, dengan sumbat karet atau tutup ulir plastik;
- h) pipet ukur 1 mL steril dengan skala 0,1 mL dilengkapi *bulb* dan *pipettor*; dan
- i) cawan petri gelas/plastik steril (berukuran minimal 15 mm x 90 mm).

A.8.2.3 Pembenihan dan pengencer

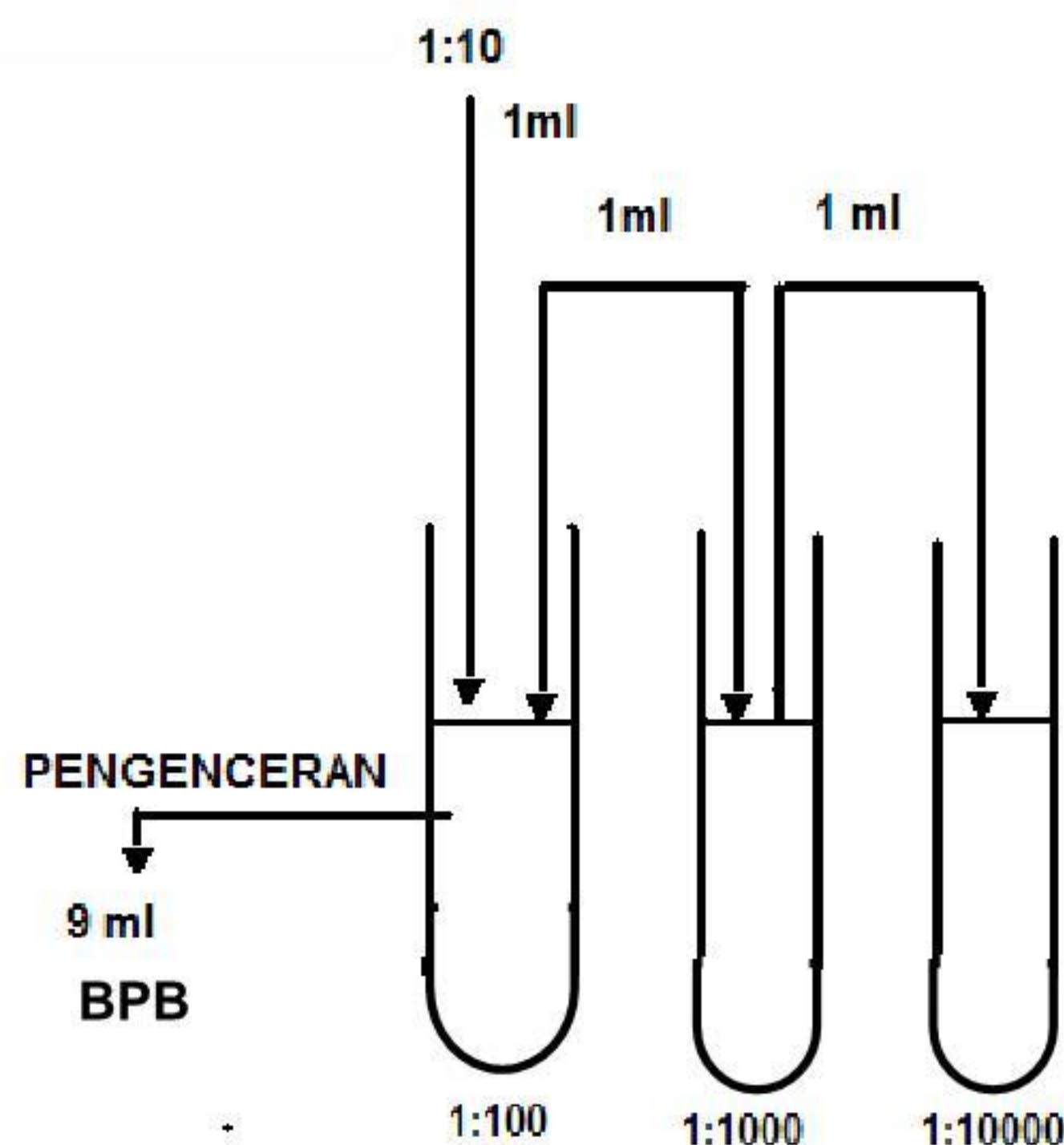
Plate count agar (PCA)

- *tryptone* 5 g
- *yeast extract* 2,5 g
- glukosa 1 g
- agar 15 g
- air suling 1 000 mL

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.8.2.4 Cara kerja

- a) Buat tingkat pengenceran sesuai kebutuhan seperti diperlihatkan pada Gambar A.1 dengan menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB)*;



Gambar A.1 - Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water* (BPB)

- pipet masing-masing 1 mL dari tingkat pengenceran (F) 10^{-1} sampai dengan 10^{-4} ke dalam cawan petri steril secara duplo;
- tuangkan 12 mL sampai dengan 15 mL media PCA yang masih cair dengan suhu $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ke dalam masing-masing cawan petri;
- goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga contoh dan pembenihan tercampur merata dan memadat;
- kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer untuk setiap contoh yang diperiksa;
- biarkan sampai campuran dalam cawan petri memadat;
- masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam inkubator pada suhu $35 ^\circ\text{C}$ selama (48 ± 2) jam; dan
- catat pertumbuhan koloni (n) pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni sampai dengan 250 koloni setelah 48 jam.

A.8.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/g) = $n \times F$

Keterangan:

- n adalah rata – rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g);
 F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai

A.8.2.6 Pernyataan hasil

A.8.2.6.1 Cara menghitung

- Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
- jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 sampai dengan

250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- c) jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus :

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

Keterangan:

C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri;

n_1 adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung;

n_2 adalah jumlah petri dari pengenceran kedua; dan

d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640.000 (6,4 \times 10^5)$

jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya:

area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2

contoh :

10^{-2}	10^{-3}	area (cm^2)	jumlah bakteri perkiraan
~	7150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6500.000 (6,5 \times 10^6)$
~	6490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5900.000 (5,9 \times 10^6)$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan

- f) menghitung koloni yang merambat;

Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :

- perambatan berupa rantai yang tidak terpisah;
- perambatan yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan; dan
- perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembenihan.

Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk lebih dari satu perambatan dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.

A.8.2.6.2 Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- a) Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- b) jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- c) jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut
 - bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

A.8.3 Bakteri *Coliform*

A.8.3.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Coliform* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung *Durham*, yang selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

A.8.3.2 Peralatan

- a) Inkubator (35 ± 1) °C terkalibrasi;
- b) penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, ($45,5 \pm 0,2$) °C;
- c) rak untuk tabung reaksi;
- d) pipet ukur 10 mL dan 1 mL dengan skala 0,1 mL steril dilengkapi *bulb* dan *pipettor*;
- e) botol pengencer terbuat dari gelas borosilikat dengan tutup ulir plastik;
- f) tabung reaksi dan tabung *Durham*; dan
- g) jarum Ose dengan diameter dalam kira-kira 3 mm.

A.8.3.3 Pembenihan pengencer dan pereaksi

- a) *Lauryl sulfate tryptose* (LST) broth / *lauryl tryptose* (LT) broth; dan
- b) *brilliant green lactose bile* (BGLB) broth 2 %.

A.8.3.4 Cara kerja

A.8.3.4.1 APM - Uji pendugaan untuk bakteri *Coliform*

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan A.8.1;
- b) inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *lauryl sulfate tryptose* (LST) broth yang didalamnya terdapat tabung *Durham* terbalik. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- c) masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu 35 °C selama (48 ± 2) jam;
- d) amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke- (24 ± 2) . Jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan positif;
- e) tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan negatif, lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- f) catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun setelah inkubasi (48 ± 2) jam, dan nyatakan tabung tersebut positif; dan

g) lakukan uji penegasan terhadap semua tabung yang positif dalam uji pendugaan.

A.8.3.4.2 APM - Uji penegasan untuk bakteri *Coliform*

- Kocok tabung LST *broth* yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- pindahkan satu Ose dari setiap tabung LST *broth* yang positif ke dalam tabung BGLB *broth* 2 % yang berlainan;
- masukkan tabung-tabung BGLB *broth* 2% ke dalam inkubator pada suhu 35 °C selama (48 ± 2) jam;
- catat semua tabung BGLB *broth* yang positif menghasilkan gas dan tentukan APM sesuai dengan Tabel A.1 berdasarkan jumlah tabung BGLB *broth* yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama (48 ± 2) jam pada 35 °C; dan
- laporkan bakteri *Coliform* sebagai APM per gram.

**Tabel A.1 - APM/ g contoh bila menggunakan 3 tabung
untuk setiap tingkat pengenceran 0,1 g/mL; 0,01 g/mL; dan 0,001 g/mL contoh**

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	10	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1 100
2	1	2	27	3	3	3	>1 100

A.8.4 Kapang

A.8.4.1 Prinsip

Pertumbuhan kapang dalam media yang sesuai setelah diinkubasi pada suhu (25 ± 1)°C selama 5 hari.

A.8.4.2 Peralatan

- Inkubator (25 ± 1) °C, terkalibrasi;
- Autoklaf;
- Penangas air (45 ± 1) °C;
- pH meter;
- Alat penghitung koloni;
- Tally register*;
- Pipet ukur 10 mL dan 1 mL, steril;
- Cawan petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril; dan
- Bent glass rod*.

A.8.4.3 Pembenihan, pengencer dan pereaksi

- Agar *dichloran rose bengal chloramphenicol* (DRBC);
- Agar *dichloran 18 % glycerol* (DG 18);
- Larutan pepton 0,1 %
 - pepton 1 g
 - Air suling 1 000 mL

Larutkan pepton dalam air suling kemudian sterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dan atur pH sehingga mencapai pH akhir ($7,0 \pm 0,2$).
- Larutan antibiotik:
 Antibiotik ditambahkan di media kapang untuk mencegah pertumbuhan bakteri. *Chloramphenicol* adalah salah satu pilihan antibiotik, karena stabil saat diautoklaf. Konsentrasi antibiotik yang diizinkan adalah 100 mg per liter media. Jika tampak pertumbuhan bakteri, siapkan media dengan penambahan 50 mg per liter *chloramphenicol* sebelum autoklaf dan 50 mg per liter *chlortetracycline* steril saat media mulai di kondisikan, tepat sebelum menuang media dalam cawan.

A.8.4.4 Persiapan dan Homogenisasi Contoh

- Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pepton 0,1 % steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- Kocok campuran beberapa kali hingga homogen

A.8.4.5 Cara kerja

- Buat tingkat pengenceran dari 10^{-2} sampai dengan 10^{-6} dengan menggunakan larutan pepton 0,1 %
- persiapan media dalam cawan dapat dilakukan dengan salah satu metode di bawah ini, yaitu :
 - metode sebar (media DRBC atau DG 18), penggunaan media DG 18 lebih sesuai untuk contoh uji yang mempunyai a_w kurang dari 0,95:
 pipet 0,1 mL masing-masing pengenceran secara aseptik ke dalam media padat dan sebar merata dengan menggunakan *bent glass rod*.
 - metode tuang (media DG 18):
 - pipet 1,0 mL masing-masing pengenceran ke dalam cawan petri dan sesegera mungkin tuangkan 20 mL sampai dengan 25 mL media;
 - campurkan dengan menggoyang cawan secara perlahan searah jarum jam, kemudian berlawanan arah jarum jam selama 1 menit sampai dengan 2 menit; dan
 - biarkan hingga campuran dalam cawan petri memadat.
- masukkan semua cawan petri dengan posisi tidak terbalik ke dalam inkubator dan inkubasi pada ruang gelap bersuhu 25 °C selama 5 hari. Jangan menumpuk cawan lebih dari 3 tumpukan. Biarkan cawan dan jangan merubah posisinya;

- d) hitung koloni pada cawan setelah 5 hari inkubasi. Jika setelah 5 hari tidak ada yang tumbuh, tambahkan waktu selama 48 jam. Jangan menghitung koloni dalam cawan sampai batas waktu inkubasi berakhir, karena merubah posisi cawan dapat mengakibatkan pertumbuhan sekunder spora; dan
- e) nyatakan hasil perhitungan sebagai koloni per gram contoh.

A.8.4.6 Pernyataan hasil

A.8.4.6.1 Cara menghitung

Hitung koloni kapang sesuai dengan A.8.2.6.1 untuk cawan yang berisi 10 koloni sampai dengan 150 koloni.

A.8.4.6.2 Cara membulatkan angka

Cara membulatkan angka pada hasil perhitungan kapang sesuai dengan A.8.2.6.2.



Bibliografi

- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18th Edition, Chapter 9.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc*. 18th Edition, Chapter 9.1.09.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercury in Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.22.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 985.61, Tin in Canned Food, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.35.
- CODEX Alimentarius Commission Volume 13 General Guideline on Sampling CAC/GL 50-2004
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Aerobic Plate Count*. Chapter 3.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2002. *Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria*. Chapter 4.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2003. *Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate*. Chapter 1.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2007. *Salmonella* sp.. Chapter 5.
- The International Organization for Standardization. 2005. Determination of Substances Characteristic of Green and Black Tea - Part 1: Content of Total Polyphenols in Tea -- Colorimetric Method Using Folin-Ciocalteu Reagent. ISO 14502-1:2005.







BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3,4,7,10
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id